

Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/KR04/002993

International filing date: 18 November 2004 (18.11.2004)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: KR
Number: 10-2003-0089714
Filing date: 10 December 2003 (10.12.2003)

Date of receipt at the International Bureau: 16 December 2004 (16.12.2004)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse



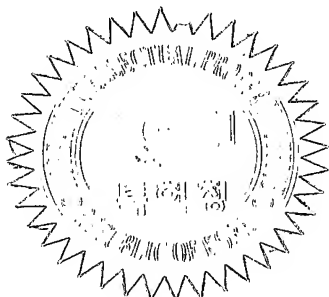
별첨 사본은 아래 출원의 원본과 동일함을 증명함.

This is to certify that the following application annexed hereto is a true copy from the records of the Korean Intellectual Property Office.

출원 번호 : 10-2003-0089714
Application Number

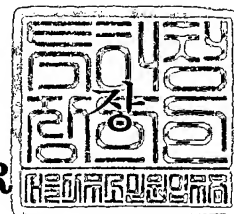
출원 년 월 일 : 2003년 12월 10일
Date of Application DEC 10, 2003

출원인 : 씨제이 주식회사
Applicant(s) CJ Corp.



2004 년 11 월 23 일

특 허 청
COMMISSIONER



【서지사항】

【서류명】	특허출원서
【권리구분】	특허
【수신처】	특허청장
【제출일자】	2003.12.10
【발명의 명칭】	5'- 크산틸산을 생산하는 미생물
【발명의 영문명칭】	A Microorganism producing 5'-Xanthylic acid
【출원인】	
【명칭】	씨제이 주식회사
【출원인코드】	1-1998-003466-9
【대리인】	
【성명】	이덕록
【대리인코드】	9-1998-000461-7
【포괄위임등록번호】	1999-001584-7
【발명자】	
【성명의 국문표기】	박영훈
【성명의 영문표기】	PARK, Young Hoon
【주민등록번호】	511229-1010425
【우편번호】	463-703
【주소】	경기도 성남시 분당구 구미동 무지개대림아파트 111동 102호
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	장재영
【성명의 영문표기】	CHANG, Jea Young
【주민등록번호】	701008-1228511
【우편번호】	431-080
【주소】	경기도 안양시 동안구 호계동 766-4 삼익아파트 101동 1701호
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	이진남
【성명의 영문표기】	LEE, Jin Nam
【주민등록번호】	780306-2675010

【우편번호】	449-709
【주소】	경기도 용인시 김량장동 현대아파트 106동 101호
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	오기훈
【성명의 영문표기】	OH,Ki-Hoon
【주민등록번호】	741025-1037222
【우편번호】	467-812
【주소】	경기도 이천시 마장면 덕평1~2리
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	김정환
【성명의 영문표기】	KIM,Jeong Hwan
【주민등록번호】	621227-1122748
【우편번호】	138-743
【주소】	서울특별시 송파구 가락2동 극동아파트 1-1401
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	오윤석
【성명의 영문표기】	OH,Yoon Suk
【주민등록번호】	591122-1017418
【우편번호】	449-846
【주소】	경기도 용인시 수지읍 풍덕천리 703 동보아파트 101동 1501호
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	심재익
【성명의 영문표기】	SIM,Jae Ick
【주민등록번호】	591224-1683612
【우편번호】	467-110
【주소】	경기도 이천시 증포동 선경2차아파트 205동 1604호
【국적】	KR
【심사청구】	청구

【미생물기탁】

【미생물기탁】

【기탁기관명】

사단법인 한국중균협회

【수탁번호】

KCCM-10530

【수탁일자】

2003.11.25

【취지】

특허법 제42조의 규정에 의한 출원, 특허법 제60조의 규정에 의한 출원심사를 청구합니다. 대리인 이덕록 (인)

【수수료】

【기본출원료】

10 면 29,000 원

【가산출원료】

0 면 0 원

【우선권주장료】

0 건 0 원

【심사청구료】

3 항 205,000 원

【합계】

234,000 원

【첨부서류】

1. 요약서·명세서(도면)_1통 2. 미생물기탁증명서_1통

【요약서】

【요약】

본 발명은 5'-크산틸산(5'-Xanthylic acid)을 생산하는 코리네박테리움 암모니아게네스(*Corynebacterium ammoniagenes*) KCCM-10448(국내특허출원 10-2002-0078694)를 친주로 하여 자외선 조사, N-메틸-N'-니트로-N-니트로소구아니딘(NTG) 등의 변이유발제로 통상적인 방법에 따라 처리하여 친주의 형질을 변형시켜, 퓨린의 생합성 과정 중에 있어 두 개의 포밀기(Formyl group)를 전달하는데 이용되는 N_5 , N_{10} -테트라히드로폴산(N_5 , N_{10} -tetrahydrofolate)의 생합성 경로를 강화하기 위하여 5-플루오로트립토판(5-Fluorotryptophan)에 대한 내성을 부여함으로써 동일한 발효 시간 내에 5'-크산틸산을 고수율, 고농도로 배양액 중에 직접 축적시키는 미생물에 관한 발명이다.

【색인어】

5'-크산틸산, 코리네박테리움 암모니아게네스, 변이유발제, 5-플루오로트립토판

【명세서】

【발명의 명칭】

5'-크산틸산을 생산하는 미생물{A Microorganism producing 5'-Xanthylic acid}

【발명의 상세한 설명】

【발명의 목적】

【발명이 속하는 기술분야 및 그 분야의 종래기술】

<1> 본 발명은 5'-크산틸산(5'-Xanthylic acid)을 생산하는 미생물 자체에 관한 것으로, 좀 더 구체적으로는 코리네박테리움 암모니아게네스(*Corynebacterium ammoniagenes*) KCCM-10448의 변이주로서 퓨린의 생합성 경로를 강화하기 위해 트립토판의 대사물 유사체인 5-플루오로트립토판(5-Fluorotryptophan)에 대한 내성을 부여하여 퓨린 생합성 경로에 참여하는 N₅, N₁₀-테트라히드로폴산(N₅, N₁₀-tetrahydrofolate)를 증가시킴으로써 동일한 발효 시간 내에 5'-크산틸산을 고수율, 고농도로 배양액 중에 직접 축적시키는 미생물에 관한 발명이다.

<2> 5'-크산틸산은 핵산 생합성 대사계의 중간 물질로 동식물의 체내에서 생리적으로 중요한 의미를 가질 뿐만 아니라 식품, 의약품 및 각종 의료분야 등 다방면에 이용되고 있다. 이에 본 발명은 당사에서 개발한 공지의 균주(KCCM-10448)로부터 5-플루오로트립토판 내성주를 선별하여 공지의 기술보다 직접 발효법으로 고농도, 고수율의 5'-크산틸산을 생산하는 균주를 개발하여 본 발명을 완성하였다.

<3> 5'-크산틸산은 퓨린 뉴클레오타이드(Purine nucleotide) 생합성 대사계의 중간 생성물로 5'-구아닐산(5'-guanylic acid)의 제조원료로서 중요한 물질이다. 정미성이 강하고 상품적 가치가 높은 5'-구아닐산의 제조방법으로서 현재 널리 이용되고 있는 방법은, 미생물 발효법으로

서 5'-크산틸산을 생산하고 이를 효소학적으로 5'-구아닐산으로 전환시키는 과정이 가장 경제적이어서 5'-구아닐산의 수요만큼 5'-크산틸산도 필요하다. 종래 5'-크산틸산의 제조방법에는 화학합성법, 효모 중의 리보핵산을 분해하여 제조된 5'-구아닐산을 탈아미노화하는 제조법이 있으며, 발효법으로는 발효배지내 전구물질로 크산틴(Xanthine)을 첨가하는 방법과 미생물 변이주에 의한 제조법, 항생물질 첨가에 의한 제조법(일본특허 소42-1477, 소44-20390) 및 계면활성제 첨가에 의한 제조법(일본특허 소42-3825, 소42-3838) 등이 알려져 있다. 이 중에서도 미생물 변이주에 의한 5'-크산틸산의 직접적인 발효 제조 방법이 공업적으로 유리하므로 본 발명자들은 기존의 코리네박테리움 암모니아게네스(KCCM-10448)가 소유하고 있는 형질을 개량하여 5'-크산틸산이 최대로 생산될 수 있는 형질을 부여함으로써 5'-크산틸산의 생산성이 월등히 증가한 변이주를 개발하였다.

【발명이 이루고자 하는 기술적 과제】

- <4> XMP를 만들기 위한 생합성 경로는 매우 복잡하며 다양한 아미노산 및 조효소들이 부가적으로 참여하는 반응이 연속되고 있다. 특히 PRPP(Phosphoribosylpyrophosphate)로부터 XMP까지 6단계의 반응 중 두 단계에 N_5 , N_{10} -테트라히드로폴산(N_5 , N_{10} -tetrahydrofolate)가 참여하고 있으며, 이들은 각각의 전구체에 포밀기(Formyl group)을 전달하는 역할을 한다.
- <5> 한편, N_5 , N_{10} -테트라히드로폴산의 생합성에 있어서는 코리슴산(Chorismate)으로부터 합성되어지는 p-아미노벤조산(p-Aminobenzoate)이 필요하다. 특히 코리슴산은 트립토판 생합성의 중간물질로 코리슴산 생산의 강화가 N_5 , N_{10} -테트라히드로폴산의 생합성의 강화로 이어질 것으로 본 발명자들은 판단하였다.

<6> 이에 따라 본 발명자들은 트립토판의 대사물 유사체인 5-플루오로트립토판에 대한 내성을 부여하여 코리슴산의 생합성을 강화, N₅, N₁₀-테트라히드로폴산을 증가시키고 이를 통해 퓨린의 생합성을 강화하여 실험해본 결과 5-플루오로트립토판 내성을 부여한 변이주가 크게 효과가 있었으며, 직접 발효법에 의해 5'-크산틸산을 기존에 비해서 고농도, 고수율로 생산할 수 있음을 발견하여 본 발명을 완성하였다.

【발명의 구성 및 작용】

<7> 이하, 본 발명의 미생물 분리 및 획득방법을 좀 더 구체적으로 설명한다.

<8> 본 발명의 미생물 CJXFT 0301(KCCM-10530)은 코리네박테리움 암모니아게네스(*Corynebacterium ammoniagenes*) KCCM-10448을 친주로 하여 자외선 조사, N-메틸-N'-니트로-N-니트로소구아니딘(NTG) 등의 변이유발제로 통상적인 방법에 따라 처리한 후 플루오로트립토판이 농도별로 첨가된 (주 3)배지에서 생육할 수 있는 변이주들 중에서 선별된 것이다. 이 때, 실험에 사용된 배지 중의 플루오로트립토판 농도는 200mg/l까지 사용하였다. 모균주의 경우 플루오로트립토판 농도 20mg/l까지 내성이 있으며 50mg/l이상에서는 전혀 성장이 일어나지 않았으므로, 본 발명자들은 플루오로트립토판 농도 100mg/l에서도 생육하는 5'-크산틸산 농도가 향상된 균주를 선별하여 이 균주를 CJXFT 0301이라 명명하고 한국종균협회에 기탁하였다(수탁번호 KCCM-10530).

<9> (주 1) 영양배지 : 포도당 20g/l, 펩톤 10g/l, 효모엑기스 10g/l, 염화나트륨 2.5g/l, 우레아 3g/l, 아데닌 150mg/l, 구아닌 150mg/l, pH 7.2

<10> (주 2) 최소배지 : 포도당 20g/l, 인산제1칼륨 1g/l, 인산제2칼륨 1g/l, 우레아 2g/l, 황산암모늄 3g/l, 황산마그네슘 1g/l, 염화칼슘 100mg/l, 황산철 20mg/l, 황산망간 10mg/l, 황

산아연 10mg/1, 비오틴 30ug/1, 티아민산염 0.1mg/1, 황산구리 0.8mg/1, 아데닌 20mg/1, 구아닌 20mg/1, pH 7.2

<11> (주 3) 플루오로트립토판 첨가배지 : (주 2) 최소배지에 플루오로트립토판 10, 20, 50, 70, 100, 200mg/1 첨가한 배지

<12> 본 발명에서 분리한 신규의 변이주 CJXFT 0301의 생화학적 특성은 하기 표 1의 기재와 같으며, 이들 내용에 의하면 본 발명의 미생물은 100mg/1 농도의 플루오로트립토판 첨가배지에서도 생육가능한 균주임을 알 수 있다.

<13> 본 발명 미생물의 특성은 다음의 표에 기재된 바와 같다.

<14> 【표 1】

플루오로트립토판에 대한 내성 비교

균주	플루오로트립토판(mg/1)						
	0	10	20	50	70	100	200
KCCM-00000	+++	++	+	-	+	-	-
CJXFT0301	+++	+++	+++	+++	++	+	-

<15> 30℃에서 5일 배양

<16> (주) +: 생육, -: 생육치 못함

<17> 실시예 1

<18> 사용균주: 본 발명의 미생물 CJXFT 0301(KCCM-10530) 및 KCCM-10448

<19> 종배지: 포도당 30g/1, 펩톤 15g/1, 효모엑기스 15g/1, 염화나트륨 2.5g/1, 우레아 3g/1, 아데닌 150mg/1, 구아닌 150mg/1, pH 7.2

- <20> 발효배지: (1) 본배지: 포도당 60g/l, 황산마그네슘 10g/l, 황산철 20mg/l, 황산아연 10mg/l, 황산망간 10mg/l, 아데닌 30mg/l, 구아닌 30mg/l, 비오틴 100ug/l, 황산구리 1mg/l, 티아민 염산염 5mg/l, 염화칼슘 10mg/l, pH 7.2
- <21> (2) 별살배지: 인산제1칼륨 10g/l, 인산제2칼륨 10g/l, 우레아 7g/l, 황산암모늄 5g/l
- <22> 발효방법: 상기 종배지 5ml을 지름 18mm 시험관에 분주하고 상법에 따라 가압 살균한 후 사용 균주를 접종하고 180rpm으로 30℃에서 18시간 진탕 배양하여 종배양액으로 사용하였다. 발효배지 중 본배지와 별살배지를 각각 상법에 따라 가압 살균하여 미리 가압 살균한 500ml 용량의 진탕용 삼각 플라스크에 29ml와 10ml씩 분주하고 종배양액 1ml를 식균한 다음 90시간 배양하였다. 회전수는 200rpm, 온도는 30℃로 조절하였다. 배양 완료 후 5'-크산틸산의 배지내 축적량은 기존 균주 KCCM-10448이 25.4g/l 이며, 본 발명 변이주 CJXFT 0301 균주는 28.6g/l이었다(5'-크산틸산의 축적 농도는 5'-크산틸산나트륨·7H₂O로 표시하였다.).

<23> 실시에 2

- <24> 사용균주: 실시에 1과 동일
- <25> 1차 종배지: 실시에 1의 1차 종배지와 동일
- <26> 2차 종배지: 포도당 60g/l, 인산제1칼륨 2g/l, 인산제2칼륨 2g/l, 황산마그네슘 1g/l, 황산철 22mg/l, 황산아연 15mg/l, 황산망간 10mg/l, 황산구리 1mg/l, 염화칼슘 100mg/l, 비오틴 150ug/l, 아데닌 150mg/l, 구아닌 150mg/l, 티아민산염 5mg/l, 소포제 0.6mg/l, pH 7.2
- <27> 발효배지: 포도당 151g/l, 인산 32g/l, 수산화칼륨 25g/l, 아데닌 198mg/l, 구아닌 119mg/l, 황산철 60mg/l, 황산아연 42mg/l, 황산망간 15mg/l, 황산구리 2.4mg/l, 알라닌염

22mg/1, NCA 7.5mg/1, 비오틴 0.4mg/1, 황산마그네슘 15g/1, 시스틴염 30mg/1, 히스티딘염 30mg/1, 염화칼슘 149mg/1, 티아민염 15mg/1, 소포제 0.7ml/1, CSL 27ml/1, 참치엑기스 6g/1, pH 7.3

- <28> 1차 종배양: 상기 1차 종배양 배지 50ml을 500ml 진탕용 삼각 플라스크에 분주하고 121℃에서 20분간 가압 살균하여 냉각한 후 사용 균주를 접종하고 30℃에서 180rpm으로 24시간 진탕 배양하였다.
- <29> 2차 종배양: 2차 종배지를 5리터 용량의 실험용 발효조에 2리터씩 분주하고 121℃에서 20분간 가압 살균한 후 냉각하여 1차 종배양액의 배양완료액 50ml을 접종한 다음 공기를 0.5vvm으로 공급하면서 900rpm, 31℃에서 24시간 배양하였다. 배양 중 pH는 암모니아수로 7.3으로 조절하였다.
- <30> 발효방법: 상기 발효배지를 30리터 용량의 실험용 발효조에 8리터씩 분주하고 121℃에서 20분간 가압 살균한 뒤 냉각하여 2차 종배양액을 1.5리터씩 접종한 후 공기를 1vvm으로 공급하면서 400rpm, 33℃에서 배양하되, 배양 중 잔존 당농도가 1% 이하가 되면 살균된 포도당을 공급하여 발효배지에 첨가된 총당의 합계가 30%로 조절하였다. 배양 중 pH는 암모니아가스로 7.3으로 조절하여 80시간 배양하였다. 배양완료 후 5'-크산틸산의 배지내 축적량은 종래균주 KCCM-10448이 145.2g/l이고, 본 발명의 변이주 CJXFT 0301은 155.4g/l이었다 (5'-크산틸산의 축적농도는 5'-크산틸산나트륨·7H₂O로 표시하였다.).

【발명의 효과】

<31> 이상 설명한 바와 같이, 본 발명은 코리네박테리움 암모니아게네스 KCCM-10448을 친주로 하여 자외선 조사, N-메틸-N'-니트로-N-니트로소구아니딘 등의 변이유발제로 통상적인 방법에 따라 처리하여 친주의 형질을 변형시킨 균주에 관한 것으로, 상기 균주는 퓨린의 생합성 과정 중에 있어 두 개의 포밀기(Formyl group)를 전달하는데 이용되는 N_5 , N_{10} -테트라히드로폴산(N_5 , N_{10} -tetrahydrofolate)의 생합성 경로를 강화하기 위하여 트립토판의 대사물 유사체인 5-플루오로트립토판(5-Fluorotryptophan)에 대한 내성이 부여됨으로써 동일한 발효 시간 내에 5'-크산틸산을 고수율, 고농도로 배양액 중에 직접 축적시키는 효과가 있다.

【특허청구범위】

【청구항 1】

코리네박테리움 암모니아게네스(*Corynebacterium ammoniagenes*)의 변이주로서 5-플루오로트립토판(5-Fluorotryptophan)에 대한 내성을 갖는 것을 특징으로 하는 5'-크산틸산 생산성 미생물.

【청구항 2】

제1항에 있어서, 상기 미생물은 코리네박테리움 암모니아게네스 CJXFT 0301 (KCCM-10530)인 것을 특징으로 하는 미생물.

【청구항 3】

제1항 또는 제2항의 미생물을 이용하여 5'-크산틸산을 생산하는 방법.

